

40. Giuseppe SERMONTI. — Genetica del *Penicillium chrysogenum*.
III. Eredità citoplasmatica in *Penicillium*. (*)

Riassunto. — I ceppi di *Penicillium chrysogenum* selezionati per l'aumento della produzione di penicillina crescono lentamente (« nani ») in confronto ai ceppi naturali. Un diploide eterozigote tra due ceppi ad alta produttività è risultato « nano » come i ceppi componenti, ma produceva settori emergenti con un fenotipo simile a quello del loro comune progenitore. Si è supposto che questo effetto fosse dovuto ad un ritardato conformarsi del citoplasma alla nuova condizione nucleare.

Si è sintetizzato un eterocarion tra un ceppo ad alta produttività « nano » ed il suo progenitore naturale a crescita normale. I conidi dell'eterocarion dettero luogo a colonie esclusivamente « nane », indipendente dal nucleo che essi contenevano. I segreganti « nani » dall'eterocarion che contenevano nuclei selvatici producevano settori emergenti con il fenotipo del ceppo naturale.

La produttività di penicillina era strettamente controllata dal nucleo.

Summary. — Strains of *Penicillium chrysogenum* selected for an increased penicillin yield are slow growing (dwarf) compared with the wild strains. A heterozygous diploid between two independently selected high rated strains was dwarf like the component strains, but it produced protruding sector with a phenotype similar to that of their common ancestor. This effect has been supposed to be due to a delayed adjustment of the cytoplasm to the newly arisen nuclear condition.

A heterokaryon has been synthesized between a high rated dwarf strain and its wild normal growing ancestor. The conidia of the heterokaryon gave rise to only dwarf colonies, irrespective of the nucleus carried by them. The dwarf segregants from the heterokaryon carrying the wild nucleus produced protruding sectors with a wild phenotype.

The penicillin productivity was strictly controlled by the nucleus.

Le prime osservazioni sul comportamento ereditario del carattere « nanismo » in *Penicillium chrysogenum* furono compiute da PONTECORVO e SERMONTI (1). Due mutanti nani furono ottenuti dal ceppo Wis

(*) Questo lavoro è stato presentato alla « Conference on extrachromosomal heredity » tenuta a Gif - sur - Yvette (1958) ed è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 407 (1959).

47.1564 dopo trattamento con U.V. Il diploide eterozigote sintetizzato da essi cresceva ad una velocità simile a quella del comune ascendente dei due ceppi componenti.

Il comportamento del « nanismo » era quello atteso. Le due mutazioni erano indipendenti, geniche e recessive.

Incrociando due altri mutanti nani, anch'essi discendenti dal ceppo Wis 47. 1564 si è ottenuto un quadro più complesso. Essi erano stati in effetti ottenuti come risultato di un programma di selezione, condotto per oltre cinque anni da diversi ricercatori presso l'Università del Wisconsin. Essi erano stati selezionati per l'aumento nella produttività di penicillina, ma il « progressivo aumento della capacità a produrre l'antibiotico... era stato accompagnato da una più o meno progressiva riduzione nel vigore vegetativo e riproduttivo. I ceppi più produttori sono tutti estremamente degenerati e stentati, in confronto al ceppo di partenza [BACKUS e STAUFFER (2)] ».

L'aspetto morfologico di un diploide eterozigote tra due ceppi alti produttori e il suo comportamento genetico sono descritti nel presente lavoro e discussi sulla base di alcuni risultati ottenuti con un eterocarion tra un ceppo naturale ed un ceppo derivato nano e alto produttore [SERMONTI e MORPURGO (3)].

MATERIALI E METODI

I mezzi di coltura e le tecniche per la produzione di mutanti e la sintesi di eterocarion sono stati già descritti nel primo lavoro di questa serie [SERMONTI (4)].

Tutti i ceppi adottati derivano da ceppi della famiglia Wisconsin [BACKUS e STAUFFER (2)], ad eccezione del ceppo NRRL 1951, che è lo ascendente isolato in natura di tutti i ceppi di detta famiglia. Il ceppo Wis 49.133 è stato ottenuto dal NRRL 1951 attraverso otto successive selezioni, alcune delle quali precedute da trattamenti con azoto-iprite (una), luce ultravioletta (due) o raggi X (una). Il ceppo Wis 51.20 deriva dal Wis 49.133 in quattro passi (trattamenti con azoto-iprite). Il ceppo Wis 53.844 discende dal NRRL 1951, in diciotto passi, sei dei quali in comune con i ceppi Wis 49.133 e Wis 51.20, ed undici su una linea distinta, dopo trattamenti con U.V. Tutti i ceppi sono stati selezionati per l'aumento della produzione di penicillina; tutti crescono poveramente e presentano ridotta sporificazione. Per poter sintetizzare gli eterocarion e i diploidi i ceppi selezionati sono stati marcati con diverse deficienze nutrizionali. Anche il ceppo NRRL 1951 è stato marcato.

Su terreno contenente le sostanze richieste le mutazioni non alterano la crescita, la sporificazione e la produttività dei ceppi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1) *Diploide eterozigote tra due ceppi nani.*

Nella prima parte del lavoro sono stati usati due ceppi nani: Wis 51.20 *bi* (richiedente biotina) e Wis 53.844 *nic* (richiedente nicotinamide).

L'eterocarion sintetizzato tra i due ceppi nani cresceva poveramente e produceva pochissimi conidi. Il micelio è stato triturato e fatto sviluppare in coltura sommersa e quindi ritrasferito su provette con agar su cui finalmente dette un numero di conidi sufficiente a permettere la selezione di un diploide eterozigote. Seminando $3,8 \cdot 10^6$ conidi su un terreno minimo, è stata selezionata una colonia prototrofa. Questa aveva conidi giganti. Dopo l'isolamento di un singolo conidio sono stati ritenuti i marcatori dei ceppi componenti ed il ceppo fu pertanto considerato diploide eterozigote. Seminato su agar esso dava luogo a colonie che presentavano povera crescita e scarsa sporificazione, con un aspetto intermedio tra quello dei due componenti aploidi (Fig. 1). Esso produceva meno penicillina di ambedue i componenti aploidi, benchè più del loro ascendente comune (Tab. 1).

TABELLA 1

(Produzione di penicillina del diploide eterozigote: Wis 51.20 *bi*/Wis 53.844 *nic*, dei suoi componenti aploidi e del loro ascendente comune: Wis 47.1564).

Ceppo	Culture Sommerse (N°)	Produzione di penicillina media (*) (unità / ml)
Wis 47.1564	3	251 ± 18
Wis 51.20 <i>bi</i>	3	1300 ± 104
Wis 53.844 <i>nic</i>	3	666 ± 18
Diploide	9	506 ± 75

(*) Sesto giorno di cultura.

Se l'incubazione delle colonie nelle scatole Petri era prolungata, dal margine di praticamente tutte le colonie emergevano settori (Fig. 2) con un fenotipo simile a quello dell'ascendente comune (Tab. 2). I settori a crescita rapida e a ricca sporificazione erano prototrofi (53 saggiati) e avevano conidi giganti (53 saggiati). La produzione di penicillina era praticamente inalterata (19 cloni saggiati in cultura sommersa).

TABELLA 2

(Velocità di crescita del diploide eterozigote: Wis 51.20 *bi*/Wis 53.844 *nic*, dei suoi componenti aploidi, del loro ascendente comune (Wis 47.1564); e dei cloni ottenuti dai settori emergenti dal diploide).

Ceppo	Velocità di crescita (*) (μ /ora)
Wis 47.1564	136,0 $\pm$ 3,0
Wis 51.20 <i>bi</i>	66,1 $\pm$ 3,2
Wis 53.844 <i>nic</i>	91,9 $\pm$ 1,6
Diploide	111,8 $\pm$ 2,8
Settori del diploide	142,7 $\pm$ 8,6

(*) Aumento del diametro delle colonie (3°-5° giorno).

Seminando conidi dalla zona centrale di una colonia settorante si otteneva lo stesso quadro: si sviluppavano colonie nane da cui emergevano settori a crescita e sporificazione normali.

La comparsa ritardata dal diploide eterozigote di un fenotipo simile a quello dell'ascendente comune dei due ceppi componenti suggeriva due possibili spiegazioni:

a) un rimaneggiamento nucleare: segregazione somatica di un gene nucleare che producesse una più rapida crescita. Bisognerebbe allora supporre una mutazione dominante verso il nanismo;

b) un rimaneggiamento citoplasmatico: un ritardo nell'espressione fenotipica dell'informazione portata dal nucleo diploide, dovuto al tardivo conformarsi del citoplasma alla nuova condizione nucleare.

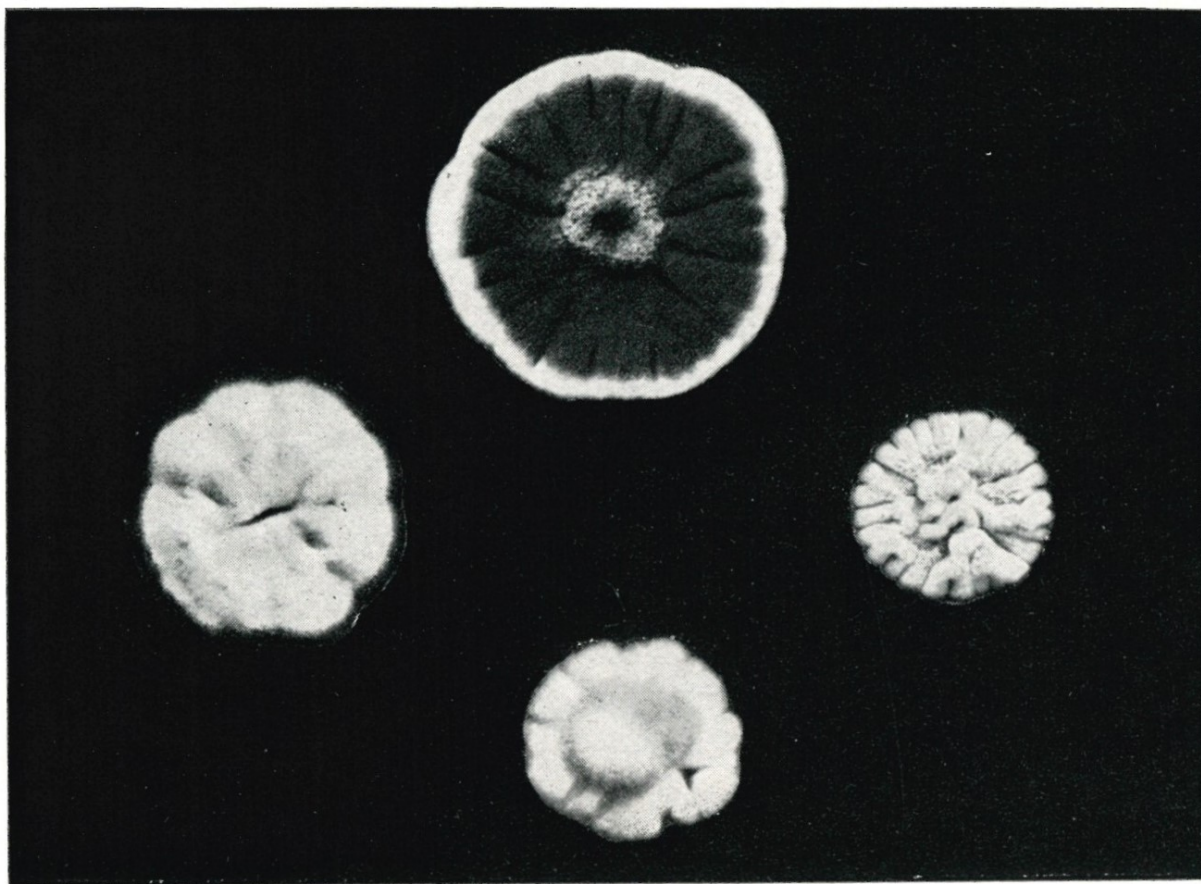


Fig. 1 - Colonie dei ceppi: Wis 47.1564 (sopra), Wis 51.20 *bi* (a sinistra), Wis 53.844 *nic* (a destra) e diploide eterozigote Wis 51.20 *bi*/Wis 53.844 *nic* (sotto).

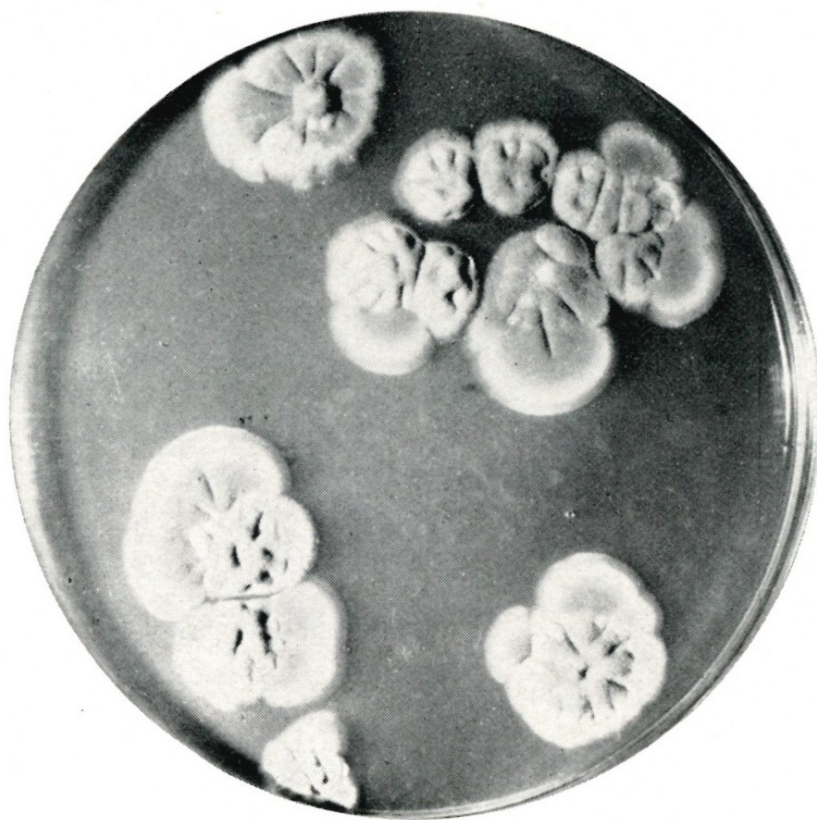


Fig. 2 - Colonie del diploide eterozigote Wis 51.20 *bi*/Wis 53.844 *nic*, che mostrano settori emergenti.

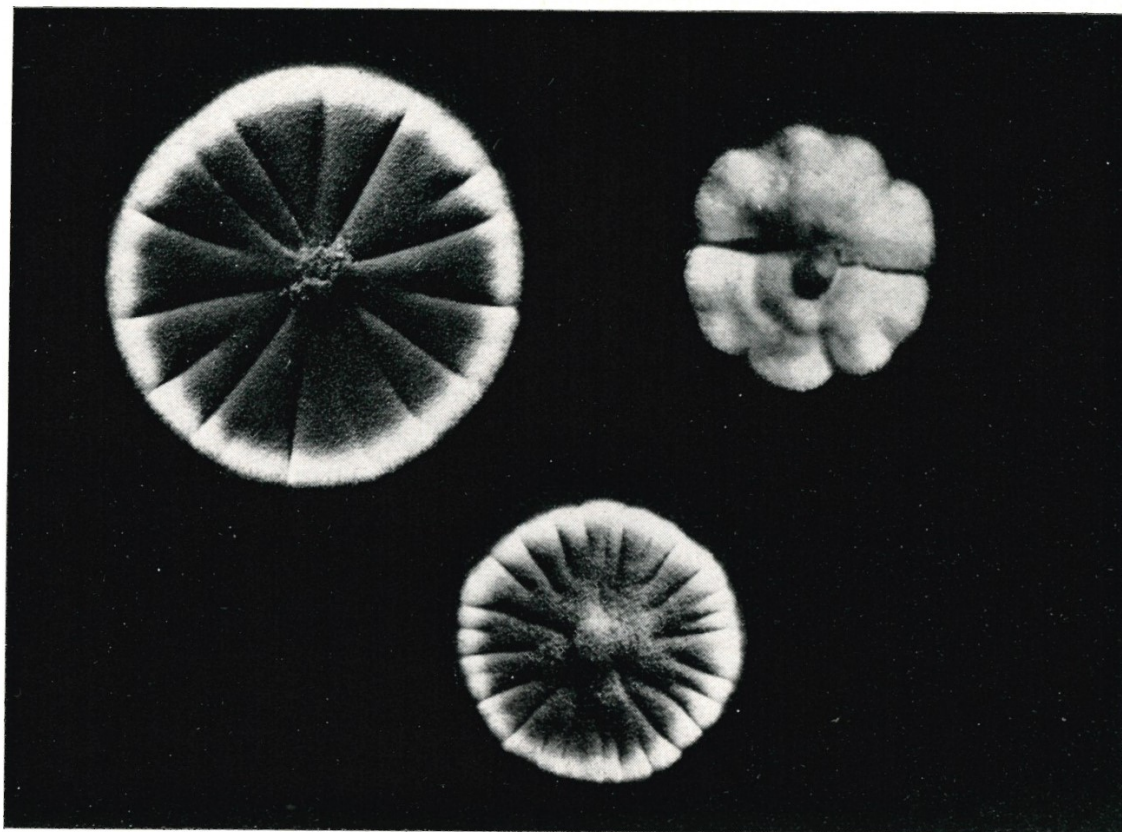


Fig. 3 - Colonie dei ceppi: NRRL 1951 *pr* (a sinistra), Wis 49.133 *py* (a destra) e segregante (*pr*) da un eterocarion tra i due (sotto).

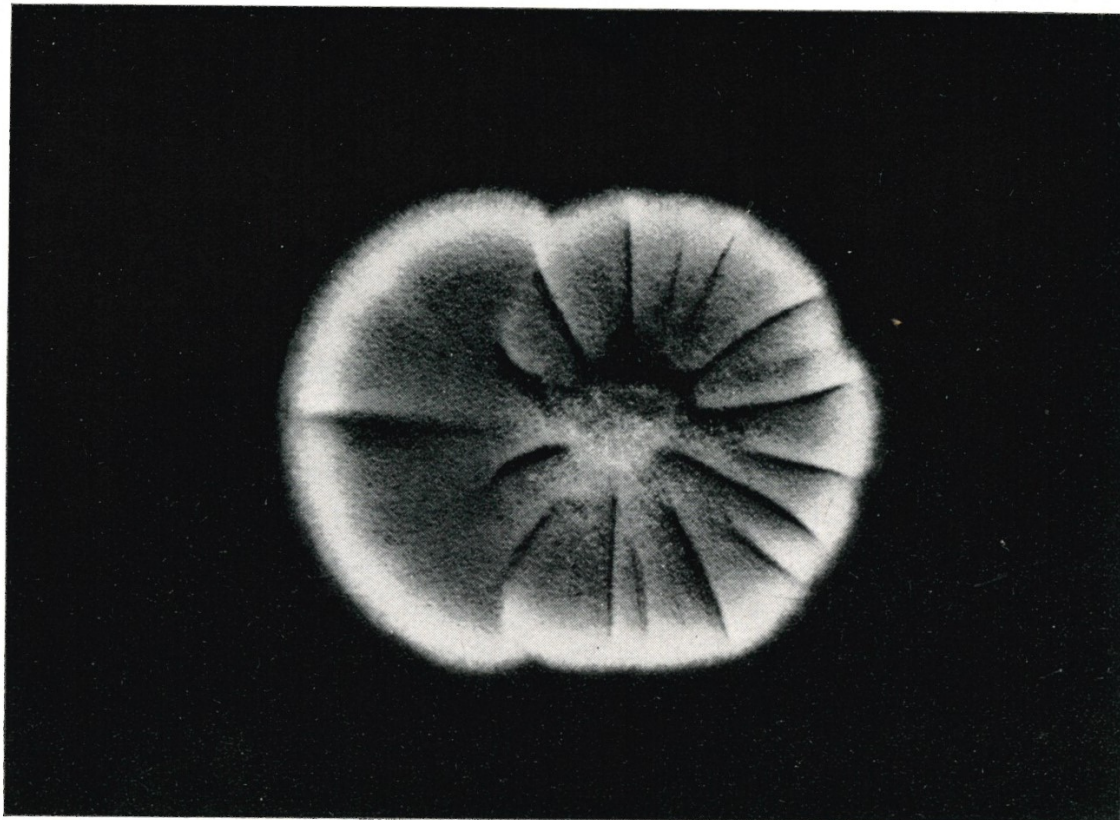


Fig. 4 - Colonia « nana citoplasmatica » che mostra un settore emergente.

La prima spiegazione presentava alcune difficoltà. Primo, i due marcatori nutritivi avrebbero dovuto segregare talvolta insieme al presunto allele recessivo per la crescita normale. Secondo, poichè la riduzione nel vigore vegetativo e riproduttivo si era regolarmente accompagnata, durante la selezione degli aploidi nani, all'aumento nella produttività di penicillina, un recupero dell'originale vigore avrebbe dovuto essere accompagnato dalla riduzione della produttività del ceppo, e quest'ultima non è stata rilevata. Terzo, la segregazione somatica ha luogo, in *P. chrysogenum* attraverso due distinti processi [SERMONTI (5)]: crossing-over somatico e aploidizzazione. I cloni originari dai settori erano sempre diploidi. Un rimaneggiamento nucleare sembrava pertanto improbabile e si doveva supporre un effetto citoplasmatico.

Giova ricordare, a questo punto, che ceppi aploidi nani con la tendenza a produrre settori normali sono stati talvolta osservati in questo laboratorio. Uno era un derivato dal ceppo Wis Q. 176; un altro era un mutante indotto con raggi ultravioletti, anch'esso dal ceppo Wis Q. 176.

Per saggiare l'ipotesi di un effetto citoplasmatico la ricerca è stata proseguita su altri ceppi, più appropriati a questo scopo [SERMONTI e MORPURGO (3)].

2) *Eterocarion tra un ceppo nano ed il suo ascendente naturale.*

Per ottenere la condizione estrema di rapida crescita e ricca sporificazione è stato impiegato il ceppo naturale NRRL 1951, che è l'ascendente di tutti i ceppi sopra menzionati. Questo è stato congiunto in eterocariosi col ceppo Wis 49.133, un derivato nano con alta produttività di penicillina.

La velocità di crescita delle colonie NRRL 1951 (misurata come aumento nel diametro per unità di tempo) è di circa 200 μ /ora. La velocità di crescita delle colonie Wis 49.133 è di circa 130 μ /ora. La sporificazione di queste ultime è povera e tardiva. I ceppi sono stati marcati: il NRRL 1951 con una richiesta di prolina (203 *pr*) e il Wis 49.133 con una richiesta di piridossina (31 *py*). Tra questi è stato sintetizzato un eterocarion bilanciato. Dall'eterocarion è stata isolata una singola ifa e dalla colonia prodotta dalla singola ifa sono stati riottenuti i nuclei dei ceppi componenti, isolati entro singoli conidi. L'isolamento di singole ife e singoli conidi è stato eseguito anche dai ceppi componenti, per controllo. L'esperimento è stato ripetuto tre volte con dati concordanti.

I cloni isolati dall'eterocarion che portavano il nucleo del ceppo alto produttore (*py*) erano indistinguibili dai cloni puri della linea di con-

trollo 31 *py*. Quelli che portavano il nucleo del ceppo naturale (*pr*) avevano, di regola, una velocità di crescita ridotta, simile a quella del ceppo alto produttore (Tav. 3). Anche la sporificazione era ridotta rispetto a quella del ceppo naturale puro (Fig. 3).

Poichè in queste condizioni non si può supporre alcuno scambio tra nuclei, i ceppi nani con nucleo del ceppo naturale (*pr*) devono differire dai ceppi naturali in qualche componente extranucleare. Essi saranno chiamati da qui in avanti « nani citoplasmatici », mentre l'espressione « nani nucleari » sarà adottata per indicare le colonie di tipo Wis 49.133 (Tab. 3).

TABELLA 3

(Velocità di crescita dei cloni segreganti dall'eterocarion (EC) 203 + 31 e dei ceppi componenti dell'eterocarion).

Ceppo	Simbolo	Velocità di crescita (*)			Medie complessive
		a	b ₁	b ₂	
Naturale	203 <i>pr</i>	209,3 ± 1,7	206,2 ± 2,5	187,7 ± 4,4	201,1 ± 2,5
Nano citoplasma t. (segregante dall'EC)	31 <i>py</i>	136,2 ± 7,9	124,8 ± 7,3	119,2 ± 6,5	125,1 ± 4,4
Nano nucleare	31 <i>py</i> ex — EC	133,9 ± 1,6	125,0 ± 1,9	136,6 ± 2,8	131,7 ± 1,5
Nano nucleare (segregante dall'EC)	203 <i>pr</i> ex — EC	125,8 ± 2,0	121,8 ± 1,8	122,6 ± 3,7	123,3 ± 1,5

Eccezionali colonie a crescita normale segreganti dall'eterocarion non sono state considerate nel calcolo delle medie. a, b₁ e b₂ indicano diversi esperimenti.

(*) Vedi nota alla Tabella 2.

Dopo tre giorni di crescita, alcune delle colonie nane citoplasmatiche mostrano uno o più settori emergenti, con un fenotipo identico a quello del ceppo naturale. Dopo cinque giorni era apparsa una media di un settore per colonia. Se la parte di una colonia non interessata da settori è trasferita, si sviluppa una colonia nana, che infine produce uno o più settori (Fig. 4). Il trasferimento è stato ripetuto sette volte successive con eguale risultato. Il numero medio di settori per colonia non cambia significativamente col succedersi dei trasferimenti.

Nondimeno è osservabile un leggero aumento della velocità di crescita dei nani citoplasmatici, particolarmente dopo i primi tre trasferimenti (velocità di crescita successive: 12,8 μ /ora, 134,0 μ /ora, 151,5 μ /ora; Wis 49.133 = 125,0 μ /ora; NRRL 1951 = 206,2 μ /ora).

E' da notare che settori emergenti non sono mai comparsi da nani nucleari, neppure da quelli riottenuti dall'eterocarion con il ceppo naturale. Questo significa che il nucleo del ceppo nano è incompatibile con una condizione di crescita normale, anche quando si trova in un citoplasma in grado di ritornare alla normalità.

La produzione di penicillina in cultura sommersa dipende strettamente dal nucleo portato dal clone saggiato, prescindendo dalla sua condizione citoplasmatica (Tab. 4). Il grado di reversione dei nani cito-

TABELLA 4

(Produzione di penicillina dei cloni segreganti dall'eterocarion (EC) 203 + 31 e dei ceppi componenti dell'eterocarion).

Ceppo	Simbolo	Culture sommerse (N°)	Produzione di penicillina media (unità/ml)
Naturale	203 <i>pr</i>	11	14,6 $\pm$ 0,5
Nano citoplasmatico (segregante dall'EC)	203 <i>pr</i> ex — EC	12	12,7 $\pm$ 0,6
Nano nucleare	31 <i>py</i>	11	434 $\pm$ 25
Nano nucleare (segregante dall'eterocarion)	31 <i>py</i> ex — EC	11	447 $\pm$ 23

plasmatici durante la crescita sommersa è stato verificato ed è risultato trascurabile. I cloni nani citoplasmatici differiscono nella loro storia dai cloni naturali puri perchè, nello emergere dall'eterocarion 203 + 31, essi hanno incorporato un citoplasma al quale aveva contribuito un ceppo nano. Inoltre questo citoplasma era stato sottoposto, per un certo periodo, all'azione dei nuclei del ceppo nano. Quale delle due possibili cause abbia prodotto la degenerazione citoplasmatica nei nani citoplasmatici non può essere ancora stabilito.

3) Conclusioni.

I risultati della dissociazione dell'eterocarion 203 + 31 chiariscono un pò la situazione nel diploide Wis 51.20 *bi*/Wis 53.844 *nic*. Nei due componenti aploidi sia il nucleo che il citoplasma risulterebbero alterati. Quando si forma il nucleo diploide eterozigote, il nucleo non è più difettoso. Esso non richiede alcun previo rimaneggiamento per consentire la crescita normale. Fornito di un nucleo normale, il citoplasma è potenzialmente ricostituito, o, che è lo stesso, è ora in condizione di trasformarsi nella condizione normale. La condizione normale del citoplasma non è perduta irreversibilmente nei ceppi nani, o, altrimenti, la sua perdita nei due ceppi esaminati è complementare.

In conclusione successivi trattamenti mutageni e selezioni avrebbero prodotto, in *P. chrysogenum*, alterazioni sia del nucleo che del citoplasma, l'ultima essendo forse una conseguenza della prima. La mutazione nucleare è recessiva rispetto alla condizione naturale, mentre l'alterazione citoplasmatica è dominante. Inoltre, le mutazioni nucleari sarebbero stabili, mentre l'alterazione citoplasmatica diverrebbe instabile non appena il citoplasma alterato venisse in contatto con un nucleo normale. In questo senso il nucleo normale consentirebbe la instaurazione della condizione normale del citoplasma; se esso permette al citoplasma alterato di revertire spontaneamente, o se induce tale reversione alla normalità, non può essere stabilito a questo stadio della ricerca.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro Internaz. di Chimica Microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PONTECORVO G. e SERMONTI G. - J. gen. Microbiol., 11: 34 (1954).
 - (²) BACKUS M. P. e STAUFFER J. F. - Mycologia, 47: 429 (1955).
 - (³) SERMONTI G. e MORPURGO G. - Convegno di Genetica, IV Riunione Ass. Genet. Ital. Suppl. a « La Ricerca Scientifica » (in stampa) (1958).
 - (⁴) SERMONTI G. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition) 17: 231 (1954).
 - (⁵) SERMONTI G. - J. gen. Microbiol., 15: 509 (1956).
-